

综述

CAR-T细胞治疗恶性肿瘤的研究现状与展望

刘小军^{1,2,3} 赵 达^{1,2,3} 白仲添^{2,3,4} 李 汛^{2,3,4*}

(1兰州大学第一医院肿瘤内科, 兰州 730000; 2甘肃省肝胆胰外科研究所, 兰州 730000;

3兰州大学临床医学院肿瘤防治中心, 兰州 730000; 4兰州大学第一医院普外二科, 兰州 730000)

摘要 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是运用重组DNA技术制备的基因工程抗体,由单链抗体、协同刺激分子及T细胞信号转导分子等部分融合而成。全外显子测序技术是传统的cDNA文库表达血清学方法之外的筛选肿瘤抗原的新方法。近年来,嵌合抗原受体-T细胞(chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T细胞)在治疗包括实体瘤在内的一系列恶性肿瘤中取得了较大的成就。临床试验表明, CAR-T细胞在产生强大抗肿瘤效应的同时,也具有不容忽视的毒副反应。该文将讨论嵌合抗原受体-T细胞治疗恶性肿瘤基本原理、关键技术和面临的挑战。

关键词 嵌合抗原受体-T细胞; 恶性肿瘤; 过继性细胞免疫治疗; 细胞因子风暴

Current Status and Future Prospect on CAR-T Cell Therapy for Malignant Tumors

Liu Xiaojun^{1,2,3}, Zhao Da^{1,2,3}, Bai Zhongtian^{2,3,4}, Li Xun^{2,3,4*}

(¹Division of Medical Oncology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Hepatopancreatobiliary Surgery Institute of Gansu Province, Lanzhou 730000, China; ³Clinical Medical College Cancer Center of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ⁴The Second Department of General Surgery, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Chimeric antigen receptor (CAR) refers to a class of genetically-engineered antibodies, consisting of single chain fragment variable, co-stimulatory molecules and T cell signal transducing molecule. Whole exome sequencing (WES) is a newly-developed strategy to identify tumor antigens and this approach has advantages over the traditional serological analysis of expression cDNA libraries (SEREX). Recently, several clinical trials have reported some promising benefits of using the CAR-T cell therapy in the treatment of a variety of cancers including solid malignant tumors, although considerable concerns and challenges have been raised. This review aims to summarize the basic concept, critical strategies and current challenges involved in the deployment of CAR-T cell therapy for malignant tumors.

Keywords chimeric antigen receptor-T cells; malignant tumors; adoptive cell therapy; cytokine storm

恶性肿瘤的免疫治疗是通过调动机体的免疫系统,增强抗肿瘤免疫效应,从而杀伤肿瘤细胞的新疗法。尽管癌细胞的免疫原性远远弱于病原生物,

但免疫系统还是有望识别和清除癌细胞。利用细胞和分子免疫学的理论,增强机体的抗肿瘤免疫,高效、安全地杀伤肿瘤细胞,是癌症免疫治疗的焦点

收稿日期: 2016-08-04 接受日期: 2016-11-17

甘肃卫生行业科研计划管理项目(批准号: GWGL2010-19)和甘肃省自然科学基金(批准号: 145RJZA036)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-8625200, E-mail: lixunemail@126.com

Received: August 4, 2016 Accepted: November 17, 2016

This work was supported by the Research Project Management Program of Gansu Health Industry (Grant No.GWGL2010-19) and the Natural Scientific Foundation of Gansu Province (Grant No.145RJZA036)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8625200, E-mail: lixunemail@126.com

网络出版时间: 2017-02-13 14:11:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170213.1411.006.html>

所在。

过继性细胞免疫治疗(adoptive cell therapy, ACT)将具有抗肿瘤活性的免疫细胞输注给癌症患者,是一种高度个体化的癌症治疗新手段^[1]。既往多使用自体肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltration lymphocytes, TIL)的ACT治疗恶性黑色素瘤,取得了较好的疗效。然而, TIL体外分离培养技术繁杂且费事费力。在除恶性黑色素瘤之外的其他恶性肿瘤中,使用TIL的ACT治疗还面临着如何鉴定和寻找抗原特异性T细胞的难题^[2]。为克服这些不足,并进一步扩大ACT的治疗范围,嵌合抗原受体-T细胞(chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T细胞)技术应运而生。

CAR-T细胞是将融合基因CAR以核酸形式导入到宿主T淋巴细胞基因组中构建而成。CAR的结构包括单链抗体、跨膜区、协同刺激分子及信号转导分子等组分^[3]。CAR-T细胞以主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)非限制性的形式特异识别和杀伤表达特定抗原的癌细胞。无论在血液肿瘤还是实体瘤, CAR-T细胞的临床研究都取得了一定的疗效^[4]。表1总结了CAR-T细胞治疗恶性肿瘤代表性的临床试验。在此,我们对CAR-T细胞的基本原理和最新研究进展作一综述。

1 CAR的结构

1.1 CAR的分子结构

CAR是一种融合分子,结构上包括单链抗体、铰链区及跨膜区。单链抗体(single chain fragment variable, scFv)来自完整单克隆抗体的可变区,包括轻链可变区(light chain variable, V_L)和重链可变区(heavy chain variable, V_H),两者由Linker连接,如图1所示。scFv保留了完整抗体对肿瘤抗原的特异性和亲和力。scFv分子量明显小于完整抗体,这有利于CAR基因的重组构建,也有利于CAR的表达。scFv也决定了CAR的抗原特异性和结合靶蛋白的非MHC限制性。目前,scFv多来自于小鼠,因此需要考虑人抗鼠抗体反应阻断CAR对肿瘤抗原识别的发生。人鼠嵌合的或完全人源化的scFv会更加安全,是未来的发展方向。scFv对肿瘤抗原的亲和力也是需要考虑的问题。但亲和力高、抗肿瘤效应强的CAR无疑也会增加“标靶”毒性的风险^[19]。

CAR胞外部分的抗原识别部分也可以是一个配体,用来识别肿瘤细胞上的受体。NKG2D、血管

内皮生长因子、heregulin(Her-3和Her-4的配体)、白介素-13(interleukin-13, IL-13)突变体、白细胞分化抗原27(cluster of differentiation 27, CD27)受体等被用来构建非scFv的CAR,在体内实验中成功用于抗肿瘤治疗,取得了一定的疗效。最近,靶向NKp30配体的CAR构建成功,可用于NKp30配体表达阳性肿瘤的治疗^[20]。

除了上述信号区域, CAR分子还需要铰链区,也称为空白区,位于scFv和跨膜区之间。一个灵活的铰链区赋予CAR一定的活动性,有利于scFv和肿瘤抗原的结合。跨膜区的插入有利于CAR在T细胞膜表面的稳定表达,也保证了CAR在T细胞膜表面的定位。Pule等^[21]的研究证实,含有CD28跨膜区的CAR在T细胞具有最高的表达,而跨膜区为OX40(肿瘤坏死因子超家族成员)和CD3 ζ 的CAR表达程度为中等和最低。含CD28分子的CAR易于形成同源二聚体,而不是形成CAR-TCR复合物。而跨膜区为CD3 ζ 的CAR易于和TCR形成异源复合物。含CD28跨膜区的CAR具有更强的功能。也有研究表明, CAR的胞内部分决定了CAR在T细胞膜表面的定向表达。目前,最为常用的跨膜区分子有CD3 ζ 、IgE Fc片段受体I(Fc ϵ RI γ)、CD4、CD8、CD28,另外还有CD7、OX40和H2-Kb(MHCI类分子的一部分)等。

1.2 CAR结构的演变

根据共刺激信号分子的不同将CAR分为三代(图1)。第一代CAR的融合分子中无共刺激分子存在, T细胞的增殖效应小,细胞因子释放少,导致抗肿瘤效应不足。第二代CAR分子包含一个协同刺激分子。CAR-T的成功治疗除了需要CD3 ζ ,还需要T细胞活化的协同刺激分子,如CD28是最常被选择使用的协同刺激分子。其他的协同刺激分子有4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS和CD27,这些分子在调节T细胞增殖、存活和抗肿瘤效应方面发挥重要作用。Porter等^[8]报道了一例接受多线治疗的慢性淋巴细胞白血病患者,在接受二代CAR治疗后获得完全缓解,伴有肿瘤溶解综合征的发生。这个二代CAR可以结合肿瘤细胞表面的CD19分子,协同刺激分子为4-1BB, T细胞信号转导分子为CD3 ζ 。第三代CAR具有两个协同刺激分子,如CD28和CD137(CD134)。

从第一代到第三代,协同刺激信号强度依次增加。第一代CAR不包含一个协同刺激分子,胞内段仅有T细胞信号转导分子CD3 ζ 或Fc γ R。第一代CAR

表1 CAR-T细胞治疗恶性肿瘤的代表性临床研究

Table 1 Representative clinical trials of CAR-T cells in the treatment of malignancies

肿瘤类型 Cancer types	目标抗原 Targeted antigens	CAR类型 Generation of CAR	研究阶段 Phase of clinical trials	ClinicalTrials.gov注册号 ClinicalTrials.gov accession No.	主要研究结果及参考文献 Outcomes and references
Follicular lymphoma, mantle cell lymphoma	CD20	Third	Phase I	NCT00621452	Of 3 cases enrolled. PFS were 24 and 12 months for 2 cases respectively. The third case achieved PR and 12 months PFS. All patients well tolerated ^[5] .
Recurrent diffuse large cell lymphoma	CD19 and CD20	First	Phase I	None	Persistence for the first-generation of CAR-T was limited (24 h-7 days); overt toxicities were not observed. Of 4 include cases, immune rejection responses were noted in 2 patients ^[6] .
B cell NHL	CD19	First and second	Phase I	None	The anti-tumor activities and persistence of the second-generation CAR-T cells were superior to that of the first-generation ones ^[7] .
CLL	CD19	Second	Phase I	None	Only 1 case was enrolled, CR. The toxicities included chill, fever, anorexia, diarrhea, fatigue and tumor lysis syndrome ^[8] .
CLL	CD19	Second	Phase I	None	Of 3 cases enrolled, 2 CR, 1 PR. Lifetime of CAR-T cells reached 6 months. The main toxicities included aplasia and depletion B cells, hypogammaglobulinemia ^[9] .
CLL, ALL	CD19	Second	Phase I	NCT00466531 (CLL) and NCT01044069 (ALL)	Of 4 cases with CLL, 3 PR. Aplasia of B cells were not observed. 1 case of ALL acquired remission, with B cell aplasia. Well tolerated ^[10] .
B lymphoma	CD19	Second	Phase I	NCT00924326	Of 8 cases, 6 PR, 1 CR. Toxicities included hypotension, fever, fatigue and renal failure, relating with serum IFN and TNF level ^[11] .
Neuroblastoma	GD2	First	Phase I	NCT00085930	Of 11 cases, 3 CR. Lifetime of CAR-T cells reached 6 months. Toxicities not reported ^[12] .
Neuroblastoma	L1-CAM	First	Phase I	None	Of 6 cases, 1 PR and 5 PD, no severe toxicities ^[13] .
Prostate cancer	PSMA	First	Phase I	NCT00664196	Of 5 cases, 3 PR and decreased PSA. The anti-tumor effect was related with serum IL-2 level. No severe toxicities happened ^[14] .
Prostate cancer	PSMA	Second	Phase I	NCT01140373	Of 3 cases, 1 PD, 2 SD for 6 months, without severe toxicities ^[15] .
Breast cancer	CEA	Second	Phase I	NCT00673829	Not report.
Colorectal cancer	CEA	Second	Phase I	NCT00673322	Not report.
Non small cell lung cancer	CerBb-2	Second	Phase I	NCT00889954	Not report.
Glioma	CerBb-2	Second	Phase I/II	NCT01109095	Of 16 cases, 8 PD, 1 PR with a 8 months' duration, 7 SD with a 6 weeks' duration, without severe toxicities ^[16] .
Osteosarcoma	CerBb-2	Second	Phase I	NCT00902044	Not report.
B cell originated NHL, CLL, MM	κ -light chain	First and second	Phase I	NCT00881920	Of 9 cases with NHL/CLL, 2 CR, 1 PR. Among 7 cases with MM, 4 PR. No severe toxicities happened ^[17] .
Ovarian cancer	FR α	First	Phase I	None	ALL 14 cases had a PD, with grade 3-4 toxicities ^[18] .

ALL: 急性淋巴细胞白血病; CEA: 癌胚抗原; CLL: 慢性淋巴细胞白血病; CR: 完全缓解; CerBb-2: 人表皮生长因子受体-2; FR α : 叶酸受体 α ; IFN: 干扰素; L1-CAM: L1-细胞黏附分子; MM: 多发性骨髓瘤; NHL: 非霍奇金淋巴瘤; PD: 进展; PFS: 无进展生存期; PR: 部分缓解; PSA: 前列腺特异性抗原; PSMA: 前列腺特异性膜抗原; SD: 稳定; TNF: 肿瘤坏死因子。

ALL: acute lymphocytic leukemia; CEA: carcinoembryonic antigen; CLL: chronic lymphocytic leukemia; CR: completely remission; CerBb-2: human epidermal growth factor receptor-2; FR α : folate receptor α ; IFN: interferon; L1-CAM: L1-cell adhesion molecule; MM: multiple myeloma; NHL: non-Hodgkin lymphoma; PD: progression disease; PFS: progression-free survival; PR: partial remission; PSA: prostate specific antigen; PSMA: prostate specific membrane antigen; SD: stable disease; TNF: tumor necrosis factor.

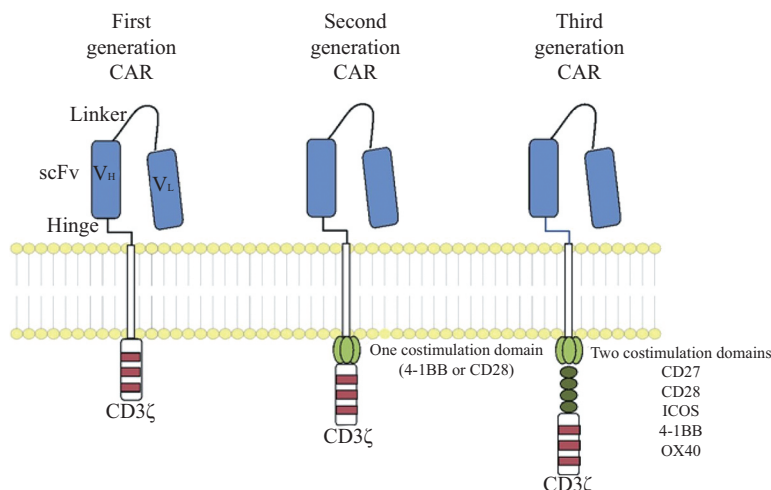


图1 CAR的结构演变(根据参考文献[16]修改)

Fig.1 Structural evolution of CAR (modified from reference [16])

尝试用于淋巴瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌和肾癌的治疗,临床获益有限。第二代CAR的研究最为广泛和深入,得到了I期临床试验的验证。第三代CAR的研究主要限于临床前领域,有待进一步研究。在CAR-T细胞中增加Caspase-9“开关”,使其在激活不久即发生凋亡,由此降低细胞因子释放不良反应的发生,有学者称之为第四代CAR-T细胞技术,但还未得到广泛认可^[22]。

2 CAR-T细胞的制备方法

图2为CAR-T细胞制备的基本过程。慢病毒和逆转录病毒都被用于基因转染的载体。慢病毒载体转染效率高,有利于CAR的长期和高效表达,可用于分裂细胞和非分裂细胞,因此使用范围更广。非病毒的转染技术也有使用,如电转染。

目前有一种无需基因整合的RNA电穿孔法,可在T细胞中表达一周以上。mRNA转染制备的CAR-T细胞效应时间短,在杀灭肿瘤细胞的同时不容易引起肿瘤溶解综合征,也不易导致大量T细胞增殖,因此发生细胞因子风暴的风险降低,具有一定的优势。最近,mRNA转染制备的短期CAR-T细胞已用于恶性实体瘤的治疗,产生了一定的抗肿瘤效应^[23]。

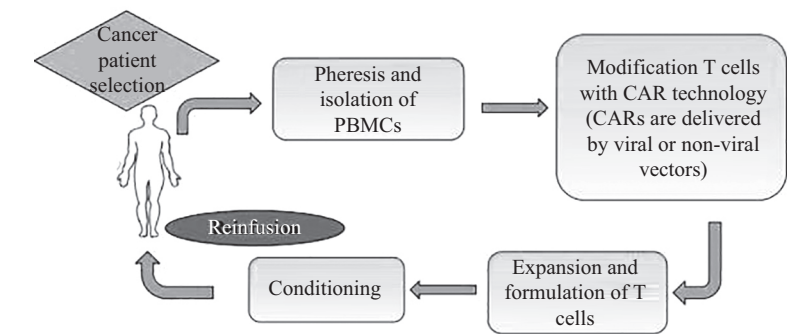
研究表明,由分化程度较低T细胞或者中心记忆T细胞亚群制备的CAR-T细胞存活时间长,抗肿瘤效应强,临床缓解率高。这些T细胞亚型可通过细胞表面标记CD62L进行富集,在体内的存活时间明显长于已分化的T细胞^[24]。研究者还在外周血发现了干细胞样T细胞,具有强大的扩增潜能,在ACT治疗中更

加有效,适合制备CAR-T细胞^[25]。另外,在T细胞培养液中加入一些细胞因子,如IL-7、IL-15和IL-21等后,可以诱导T细胞亚群向未分化方向发展^[26]。趋化因子在驱使T细胞迁移方面发挥重要作用。CAR-T细胞上特定趋化因子受体的表达,如CXCR2和CC趋化因子受体2b(CC chemokine receptor 2b, CCR2b),有助于T细胞向肿瘤组织的迁移^[27]。

3 CAR-T细胞的给药途径

图3为CAR-T细胞从制备到回输的全部过程。全身给药途径,即静脉注射给药方式简单易行,在临床应用中受到青睐。但几个临床前研究使用了瘤体内注射、腹腔内注射的局部给药方式,取得了较好的疗效,并部分认为与肿瘤组织内的T细胞数量增加有关。

研究表明,腹腔注射或者瘤内注射后CAR-T细胞主要保留在接种部位,流向全身的细胞很少。相反,静脉注射后CAR-T细胞起初到达肺脏,再分布到脾、肝和淋巴结。在一些临床试验中,输注HER-2和碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CAIX)特异性CAR-T细胞后出现了快速的肺毒性和肝毒性,考虑与CAR-T细胞静脉输注后的分布有关^[29]。Maher等^[30]的研究表明,腹腔或静脉注射中等剂量的HER-2特异性CAR-T细胞在小鼠肿瘤模型中体现了抗肿瘤效应,没有明显的毒性反应。当CAR-T细胞大量腹腔注射时,发生了细胞因子风暴。当在瘤体内注射时,T细胞在注射部位停留了数天,促使肿瘤退缩,没有发生明显的细胞因子释放。另外,RNA电转染制备的CAR-T细胞



PBMC: 外周血单个核细胞。
PBMC: peripheral blood mononuclear cell.

图2 CAR-T细胞的构建过程
Fig.2 Construction process of CAR-T cells

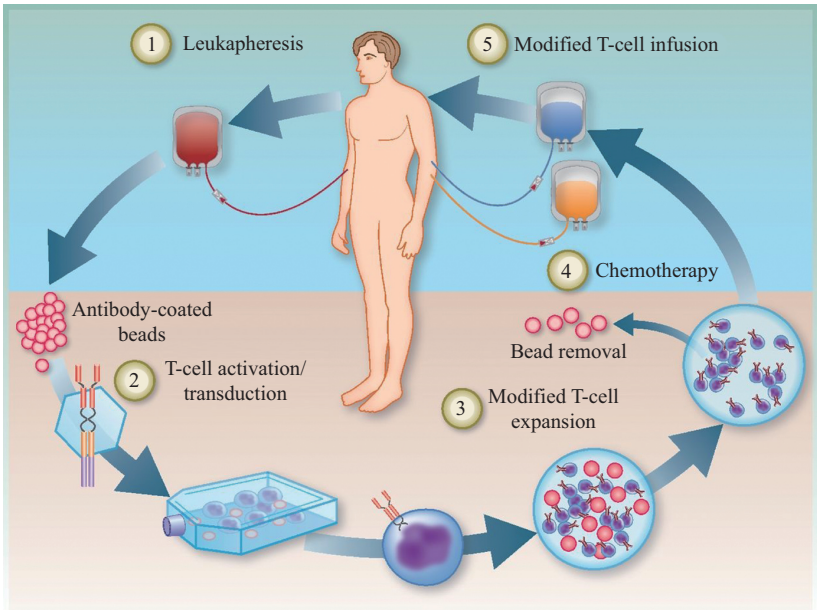


图3 CAR-T细胞的构建与回输全过程(根据参考文献[28]修改)
Fig.3 The whole manufacture and reinfusion process of CAR-T cells (modified from reference [28])

CAR的表达时间短暂, 更加适合于瘤内注射。

临床研究也显示了瘤内或腹腔内注射CAR-T细胞的可行性和安全性。Maher等设计了一个I期临床试验(ClinicalTrials.gov No.: NCT01818323), 用来验证CAR-T细胞瘤内注射治疗局部晚期或转移性头颈部鳞癌的疗效和安全性。

总之, CAR-T细胞的剂量和给药途径非常重要, 瘤内注射有望成为一种安全、有效的给药方式。CAR-T细胞局部给药降低了“标靶”毒性和“脱靶”毒性的发生, 是一种优选的给药方式。

4 肿瘤抗原的选择

CAR-T细胞的肿瘤靶抗原往往是肿瘤相关性

的, 而不是肿瘤特异性的。CAR-T细胞治疗恶性肿瘤时, 无论潜在的“标靶效应”还是“脱靶效应”, 都是需要关注的问题。对于CAR-T的过继性细胞免疫治疗, 恰当选择肿瘤抗原是前提。CD19广泛表达于儿童最常见的恶性肿瘤——急性淋巴细胞白血病, 而CD19在非肿瘤组织的表达仅限于B细胞及其前体细胞, 在造血干细胞上没有表达。目前, CD19被广泛作为CAR-T细胞的肿瘤靶抗原并取得了成功。靶向CD19 CAR-T细胞的不良反应仅限于B细胞发育不全和体液免疫受损, 被认为是可以良好耐受的不良反应^[31]。相反, 靶向HER-2的CAR-T细胞治疗结肠癌的患者却在过继性治疗的5天后死亡。死亡原因考虑为细胞因子风暴以及呼吸衰竭, 源于肺泡上

皮细胞表面的少量抗原被识别^[31]。这些研究表明,构建CAR-T的肿瘤相关抗原应该严格限制于肿瘤细胞和其他非关键细胞的细胞膜表面。

肿瘤抗原的表达丰度对于CAR-T细胞治疗疗效的影响尚不明确。有迹象表明, CAR-T细胞往往杀灭高表达特定肿瘤靶抗原的肿瘤细胞,低表达靶抗原的肿瘤细胞往往对CAR-T治疗产生抗拒,这是CAR-T细胞的不足所在。另一方面,正常细胞表面相同抗原表达越低,则对CAR-T细胞的敏感性越低,安全性更高。

重组cDNA文库的血清学分析(serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)是目前使用最为广泛的肿瘤抗原筛选方法^[32]。这种方法需要首先建立肿瘤cDNA表达文库,然后用肿瘤患者的血清筛选出阳性克隆;对阳性克隆进行生物信息学分析, SEREX法基于这样的假设:肿瘤患者体内的B细胞可以识别自身肿瘤抗原,肿瘤患者血清中可能含有针对肿瘤抗原的特异性抗体^[32]。目前,通过SEREX法筛选的肿瘤抗原达1 500种。所建cDNA文库的库容量、重组cDNA的完整性、肿瘤标本的来源等因素会影响SEREX法的可信度。另外, SEREX法筛选到一些肿瘤抗原虽可被CD4⁺T细胞识别,却不能被CD8⁺T细胞识别。寻找能够真正引起CD4⁺和/或CD8⁺T细胞反应的肿瘤抗原,是SEREX法面临的另一个挑战^[32]。总之, SEREX法鉴定肿瘤抗原取得了较大的成功,但仍需不断改进和完善。

全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)技术外显子组测序是指利用序列捕获或者靶向技术将全基因组外显子区域DNA富集后再进行高通量测序的基因组分析方法,可作为筛选和鉴定肿瘤抗原的新方法^[33]。WES首先分析恶性肿瘤全外显子序列数据,筛选在恶性肿瘤患者中表达的异常突变蛋白,继而合成筛选出的突变T细胞抗原表位,并用一种“MHC结合算法”对筛选出的候选抗原表位进行分析^[34]。这种新技术能够更快、更容易地鉴别出免疫系统T细胞识别的突变基因抗原。

5 CAR-T细胞的毒副反应

CAR-T细胞对正常组织中靶抗原的免疫识别称为“标靶和脱肿瘤效应”^[35]。“标靶”毒性首次报道了CAIX特异性CAR-T细胞治疗转移性肾细胞癌的研究。这个研究发现,肝脏转氨酶的轻度升高比较

常见,考虑与CAIX特异性CAR-T细胞识别了CAIX,这个抗原在胆管上皮细胞轻度表达。CD19特异性CAR-T细胞清除正常B细胞的清除也是一种“标靶”毒性,可以通过静脉注射丙种球蛋白治疗^[36]。

此外,在CD19特异性CAR-T细胞治疗血液肿瘤的研究中,部分患者发生了肿瘤溶解综合征和细胞因子释放综合征。肿瘤溶解综合征表现为代谢异常,发生机制为溶解的肿瘤细胞胞内代谢产物的快速释放。血液肿瘤初始化疗后容易出现肿瘤溶解综合征。肿瘤溶解综合征也可表现为延迟性发作,在CD19特异性CAR-T细胞输注后1月发生。肿瘤溶解综合征已经被成功治疗,包括使用别嘌醇、水化、碱化尿液以及使用拉布立酶等^[9,37-38]。

细胞因子释放综合征表现为恶心、头痛、心动过缓、低血压、皮疹和气短。接受CAR-T细胞的血液肿瘤患者容易出现细胞因子释放综合征。严重的细胞因子释放综合征被称为细胞因子风暴,具有致命的危险。细胞因子释放综合征多发生在输注CAR-T细胞后6~20 d,也可发生在输注的即刻,与CAR的结构、患者的基础疾病及基因多态性相关。目前,针对细胞因子释放综合征的治疗方法包括应用糖皮质激素、细胞因子拮抗剂以及支持治疗。CAR-T细胞引起的死亡可以通过优化CAR的结构、增加CAR的安全性来降低;需要遵循严格的剂量-爬坡方案,严密观察炎性细胞因子释放情况,及时采取有效措施,包括使用各种细胞因子拮抗剂治疗^[29]。

过敏反应也是CAR-T细胞的毒性反应之一。Maus等^[29]报道了4例接受mRNA电穿孔法制备的抗人表皮素CAR-T细胞治疗的患者,其中1例患者出现过敏和心脏骤停,发生在CAR-T细胞的第三次输注后数分钟内,多考虑为CAR结构中鼠源性抗体序列表达导致机体释放IgE所致。这些结果表明, mRNA CAR-T细胞中CAR的鼠源抗体具有潜在的免疫源性,其安全性值得重视,特别是对接受间歇疗法的患者。

6 结语与展望

CAR-T细胞治疗是一种新型过继性细胞免疫治疗方法,在一些肿瘤治疗中取得了令人瞩目的成就,具有广阔的应用前景。以上,我们讨论了CAR-T细胞的基本原理以及制备和应用中相关的关键问题。肿瘤抗原的合理选择是构建CAR-T细胞的前体。

CAR的设计、scFv的亲合力、靶抗原的表达丰度、肿瘤负荷以及CAR-T的给药途径都会影响CAR-T细胞的疗效。目前, CAR-T细胞的治疗正在由血液肿瘤向实体肿瘤扩展。CAR-T细胞仍然需要进一步的改进和优化, 在抗肿瘤效应方面需要更加强大、更加持久, 更容易向肿瘤组织迁移, 也可以构建类似于CAR-T的CAR-NK细胞, 这些都需要免疫学理论和重组DNA技术的密切结合。

尽管临床研究取得了令人鼓舞的成果, 但一些免疫抑制通路的存在无疑会限制CAR-T细胞的抗肿瘤效应。活化T细胞上抑制性分子与肿瘤细胞上相应配体的结合会妨碍T细胞的功能。T细胞激活后T细胞抑制性免疫受体的表达增高, 限制了过继性免疫效应的时限和程度^[39]。对恶性实体瘤患者使用单抗阻断程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)和程序性死亡配体-1(programmed death-ligand 1, PD-L1)的临床研究取得了令人鼓舞的结果, 阻断这类抑制性通路可以增强CAR-T细胞的抗肿瘤效应^[40]。John等^[41]的研究首先证实, 将HER-2特异性CAR-T细胞与PD-L1和HER-2双阳性肿瘤细胞共培养后, CAR-T细胞上PD-1(PD-L1的受体)的表达明显增加; 进一步发现, 抗PD-1抗体的使用可明显增加CAR-T细胞的体内抗肿瘤效应。CAR-T细胞联合抗PD-1单抗治疗恶性肿瘤值得进一步的临床研究。

前已述及, CAR-T细胞引起的“细胞因子风暴”是一种严重的毒副反应。在CAR分子中插入自杀基因作为“安全开关”(如Caspase-9)可以增加CAR-T细胞的安全性, 降低治疗风险, 扩大临床应用范围^[42]。当然, 所有这些思路的改进都需要在实验室水平和临床上进一步验证。总之, CAR-T细胞在恶性肿瘤的综合治疗中必将扮演越来越重要的角色。

参考文献 (References)

- Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348(6230): 62-8.
- Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(2): 233-40.
- 曹玲, 张毅. 嵌合抗原受体修饰T细胞治疗恶性肿瘤的研究进展. *兰州大学学报(医学版)*(Cao Lin, Zhang Yi. Development of chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of malignancies. *Journal of Lanzhou University, Medical Sciences*) 2015; 41(1): 1-8.
- Curran KJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptor T cells for cancer immunotherapy. *J Clin Oncol* 2015; 33(15): 1703-6.
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, *et al.* CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood* 2012; 119(17): 3940-50.
- Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, *et al.* Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(9): 1245-56.
- Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, *et al.* CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011; 121(5): 1822-6.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725-33.
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; 3(95): 95ra73.
- Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011; 118(18): 4817-28.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; 119(12): 2709-20.
- Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, *et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011; 118(23): 6050-6.
- Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, *et al.* Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 2007; 15(4): 825-33.
- Junghans RP. Role for IL2 adjunctive cotherapy for suppression of a solid tumor with designer T cells: Phase I trial data in prostate cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 2013.
- Slovin SF, Wang X, Borquez-Ojeda O, Stefanski J, Olszewska M, Taylor C, *et al.* Targeting castration resistant prostate cancer (CRPC) with autologous PSMA-directed CAR⁺ T cells. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 2012.
- Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielamowicz K, Wakefield A, Ghazi A, *et al.* Autologous HER2 CMV bispecific CAR T cells are safe and demonstrate clinical benefit for glioblastoma in a Phase I trial. *J Immunother Cancer* 2015; 3(2): 1.
- Ramos CA, Savoldo B, Torrano V, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, *et al.* Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains. *J Clin Invest* 2016; 126(7): 2588-96.
- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20): 6106-15.

- 19 Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 2013; 3(4): 388-98.
- 20 Shi H, Sun M, Liu L, Wang Z. Chimeric antigen receptor for adoptive immunotherapy of cancer: Latest research and future prospects. *Mol Cancer* 2014; 13: 219.
- 21 Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 2005; 12(5): 933-41.
- 22 Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol* 2014; 5: 235.
- 23 Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, *et al.* Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce antitumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(2): 112-20.
- 24 Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: Which T cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J Immunother* 2012; 35(9): 651.
- 25 Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 2011; 17(10): 1290-7.
- 26 Pouw N, Treffers-Westerlaken E, Kraan J, Wittink F, Ten Hagen T, Verweij J, *et al.* Combination of IL-21 and IL-15 enhances tumour-specific cytotoxicity and cytokine production of TCR-transduced primary T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59(6): 921-31.
- 27 Craddock JA, Lu A, Bear A, Pule M, Brenner MK, Rooney CM, *et al.* Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother* 2010; 33(8): 780.
- 28 Maus MV, June CH. Making better chimeric antigen receptors for adoptive t-cell therapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22(8): 1875-84.
- 29 Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010; 18(4): 843-51.
- 30 van der Stegen SJ, Davies DM, Wilkie S, Foster J, Sosabowski JK, Burnet J, *et al.* Preclinical *in vivo* modeling of cytokine release syndrome induced by ErbB-retargeted human T cells: Identifying a window of therapeutic opportunity? *J Immunol* 2013; 191(9): 4589-98.
- 31 Leuci V, Mesiano G, Gammaitoni L, Aglietta M, Sangiolo D. Genetically redirected T lymphocytes for adoptive immunotherapy of solid tumors. *Curr Gene Ther* 2014; 14(1): 52-62.
- 32 Pfreundschuh M. Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemother* 2000; 46(1): S3-7.
- 33 Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, *et al.* Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013; 19(6): 747-52.
- 34 Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; 348(6230): 69-74.
- 35 Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: First clinical experience. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): e20-2.
- 36 Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368(16): 1509-18.
- 37 姜丽翠, 游凤涛, 宗云辉, 孟会敏, 安钢力, 张波桢, 等. 嵌合体抗原受体修饰的T细胞对CD19⁺套式淋巴瘤细胞的杀伤. 免疫学杂志(Jiang Licui, You Fengtao, Zong Yunhui, Meng Huimin, An Gangli, Zhang Bozhen, *et al.* Cytotoxicity of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19⁺ mantlecell lymphoma. *Immunological Journal*) 2015; 31(4): 277-82.
- 38 李欢欢, 朱平, 伍学强, 刘玉峰. 应用CD19修饰的嵌合抗原受体T细胞治疗淋巴瘤白血病. 中国实验血液学杂志(Li Huanhuan, Zhu Ping, Wu Xueqiang, Liu Yufeng. Treatment of lymphoblastic leukemia with CD19-specific modified chimeric antigen receptor T cells. *J Exp Hematol*) 2014; 22(6): 1753-6.
- 39 Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252-64.
- 40 Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455-65.
- 41 John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, *et al.* Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res* 2013; 19(20): 5636-46.
- 42 Rossig C. Extending the chimeric receptor-based T-cell targeting strategy to solid tumors. *Oncoimmunology* 2013; 2(10): e26091.